Zur Kenntnis der Aminoacyleinlagerungsreaktion an aliphatischen N-substituierten O-Aminoacyl-ß-Hydroxy-Carbonsäureamiden

Verkürzte Fassung der

Inauguraldissertation

zur Erlangung
der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Hans Moser

aus Ruswil (Luzern)

1962

Basel
Ed. Blaettler Lichtpaus- und Plandruckanstalt
1967

ZUR KENNTNIS DER AMINOACYLEINLAGERUNGSREAKTION AN ALIPHATISCHEN N-SUBSTITUIERTEN O-AMINOACYL-β-HYDROXY-CARBONSÄUREAMIDEN

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

HANS MOSER
aus Ruswil (Luzern)

Basel
Ed. Blaettler Lichtpaus-und Plandruckanstalt
1967

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der
Herren Professoren Dr.M.Brenner und Dr.C.A.Grob

Basel, den 6.November 1962

Prof.Dr. M.Eichler
Dekan

Herrn Hans Moser wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 6.Nov. 1962 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner am 6.November 1962 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

"Zur Kenntnis der Aminoacyleinlagerungsreaktion an aliphatischen N-substituierten O-Aminoacyl-β-hydroxycarbonsäureamiden"

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im organ.chemischen Institut der Universität Basel
2. in der Universitätsbibliothek Basel
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.

UNIV. LEIDEN BIBL.

ZUR KENNTNIS DER AMINOACYLEINLAGERUNGSREAKTION AN ALIPHATISCHEN N-SUBSTITUIERTEN O-AMINOACYL-β-HYDROXY-CARBONSAUREAMIDEN.

Die von J.P.Zimmermann (1) im Jahre 1952 beschriebene Umlagerung von O-Aminoacyl-salicylsäuren bzw. O-Aminoacyl-salicylsäureamiden in die entsprechenden N-Salicoylamino-säure-Derivate wurde in der Folge als Aminoacyleinlagerung (AAE) (2) bezeichnet.

Bei der Peptidsynthese nach dem Prinzip der AAE mit einer β-Hydroxysäure als Aminoacyl-Akzeptor (3) sollte es prinzipiell möglich sein, eine beidseitig geschützte Peptidkette entweder N-endständig oder kettenintern zu vergrössern. Dass die Durchführung einer N-endständigen Verlängerung möglich ist, zeigten M.Brenner et al. (2), indem sie mit dem Salicoyl-rest als Akzeptor ein Salicoyltripeptid synthetisieren konnten. Anders verhält es sich jedoch bei einer ketteninternen Vergrösserung eines Peptides, bei der als Akzeptor für die einzulagernde Aminoacylgruppe beispielsweise der Serylrest dienen kann. A.Hartmann (2),(4), der die AAE vom aromatischen in das aliphatische System übertrug, konnte zwar in guter Ausbeute O-Glycyl-β-hydroxybuttersäureamid, O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinamid und O-Glycyl-N-benzoyl-glycyl-DL-serinamid in die entsprechenden Umlagerungsprodukte überführen.

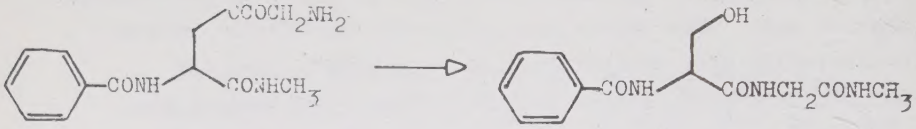
Es gelang bisher aber nicht, die AAE-Reaktion bei am Amidstickstoff substituierten aliphatischen O-Aminoacyl-β-hydroxysäureamiden eindeutig (d.h. durch Vergleich von Spektren und Smp.) nachzuweisen. Beim einzigen Versuch in dieser Richtung konnte das Umlagerungsprodukt von O-Phenyl-alanyl-N-benzoyl-seryl-glycinamid nur papierchromatographisch identifiziert werden (4).

Nachdem an Beispielen aus der Salicylsäurereihe gezeigt worden war, dass es prinzipiell möglich ist, am Amidstickstoff

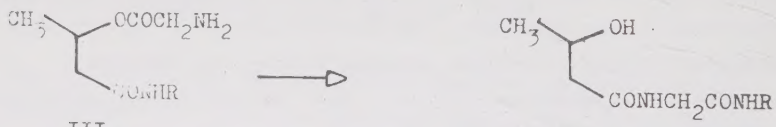
substituierte O-Aminoacyl-β-hydroxysäureamide in die entsprechenden β-Hydroxyacyl-aminosäureamiden umzulagern - es spielt dabei keine Rolle, ob der substituent am Amidstickstoff einen negativen oder positiven I-Effekt ausübt (5) - schien es angebracht zu sein, ähnliche Versuche im aliphatischen Bereich durchzuführen.

In Schema I sind die in dieser Arbeit untersuchten Umlagerungsbeispiele wiedergegeben.

Schema I



I II



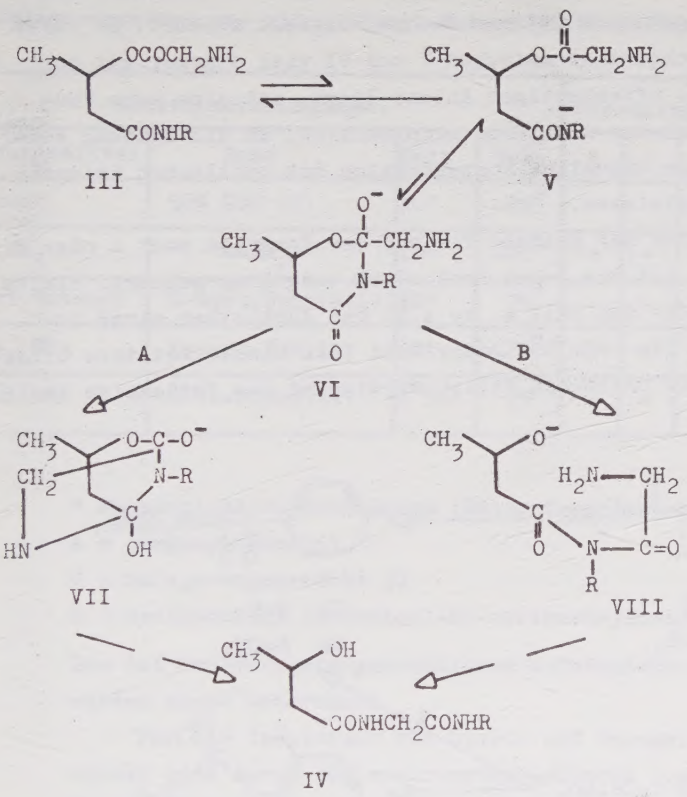
III IV

III,IV a R = CH_3
b R = CH_2CONH_2
c R = $CH_2CONHCH_3$
d R = $CH_2CON(CH_3)_2$

Die Auswahl der Verbindungen erfolgte nach den sich im Laufe der Untersuchungen jeweils ergebenden Gesichtspunkten. Als Aminoacylrest wurde in allen Verbindungen der Glycylrest gewählt, weil mit dieser einfachsten Aminosäure bei der Umlagerung die geringste sterische Hinderung zu erwarten ist. Ferner wurden stets optisch inaktive β-Hydroxy-

säuren eingesetzt. Die Frage nach der Erhaltung der optischen Aktivität bei der Umlagerung der hier untersuchten Verbindungen bleibt offen.

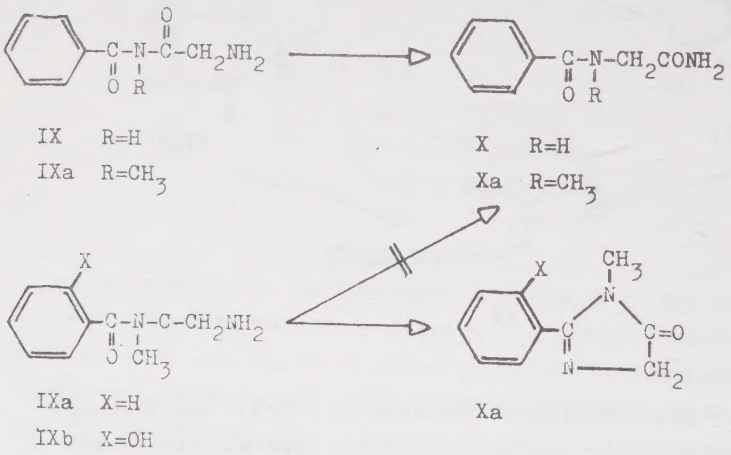
Für den Reaktionsverlauf der AAE stehen bekanntlich zwei Mechanismen zur Diskussion. Ein Fall A, bei dem intermediär ein bicyclisches Zwischenprodukt VII (2),(4),(5) und ein Fall B, bei dem ein Diacylimid VIII (6),(7) auftritt:



Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der AAE-Reaktion ist sehr wahrscheinlich die Cyclisierung V⟶VI (nukleophiler Angriff des Amidstickstoffes am Estercarbonyl-

kohlenstoff unter Ausbildung des cyclischen Anions VI). Die Bildung dieses cyclischen Anions ist nun bei den Salicylsäure-Derivaten vor allem sterisch ausserordentlich begünstigt. Diese Begünstigung fehlt in der aliphatischen Reihe hingegen. (Vergl. 2). Um dennoch eine solche Anionenbildung und damit eine Umlagerung zu erreichen, muss eine starke Base, wie z.B. Kalium-tert. butylat verwendet werden. Denn nur durch eine hinreichende Ionisierung der Amidgruppe in III kann soviel cyclisches Anion gebildet werden, dass die AAE mit vernünftiger Geschwindigkeit abläuft. Da zudem das Gleichgewicht zwischen V und VI viel stärker auf der Seite des offenkettigen Anions liegt, ist eine hohe Konzentration des letzteren erforderlich, um die Bildung einer genügenden aktuellen Konzentration des cyclischen Anions zu gewährleisten.

Ob nun der weitere Verlauf der Reaktion nach A oder B erfolgt, ist bis jetzt noch nicht endgültig geklärt. Vieles spricht für den Fall A, so z.B. das Ausbleiben einer Umlagerung IXa⟶Xa bei Diacylimid IXa. Dieses letztere bildet nämlich im basischen Milieu vorwiegend das Imidazolon Xa (8).



O-Glycyl-salicylsäure-methylamid dagegen gibt das Umlagerungsprodukt Salicoyl-glycin-methylamid (5). Daraus folgt, dass eine Verbindung ähnlich IXb als Zwischenprodukt der AAE wenigstens in der Salicylsäurereihe unwahrscheinlich ist.

Tabelle I

Umlagerungsversuche mit O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinmethylamid I

Reaktionsbedingungen				Chromatogr.Analyse *			
Lösungsmittel	Base	Zeit	Temp.	A	U	S	Nebenprod.
Wasser	50% KOH (9)	10'	-20°	+	-	++	
fl.NH_3	$NaNH_2$	10'	-70°	+	(+)	++	+
tert.Butanol	K-tert.Butylat(2)	50'	25°	+	-	++	+
abs. DFA	K-tert.Butylat	50'	25°	+	+	++	+
abs. DFA	K-tert.Butylat	2h30'	25°	-	+	++	+

* Dünnschicht-Chromatogramm (Chloroform/Isopropanol 3:1)
A = Ausgangsmaterial I
U = Umlagerungsprodukt II
S = Spaltprodukt (N-Benzoyl-DL-serinmethylamid)

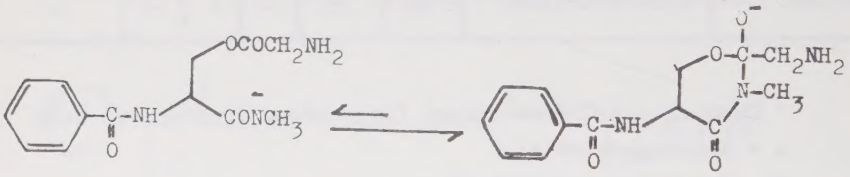
Die bei den Umlagerungsreaktionen entstandenen Nebenprodukte wurden nicht untersucht.

Für die Isolierung von Spalt- und Umlagerungsprodukt eignet sich deren säulenchromatographische Trennung an Kieselgel in der im experimentellen Teil beschriebenen Ausführungsform. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass als Elutionsmittel die gleichen Solventien verwendet werden, die bei der Dünnschicht-Chromatographie als gut

trennende Fliessmittel dienen.

Aus dem Reaktionsgemisch einer Umlagerung im Milieu Dimethylformamid/Kalium-tert.Butylat konnten auf diese Weise neben 58% Spaltprodukt 2% Umlagerungsprodukt II in reiner Form isoliert werden. Die Identifizierung erfolgte durch den Vergleich mit auf anderem Wege hergestelltem Material (Mischsmp., IR-Spektrum und chromatographisches Verhalten.)

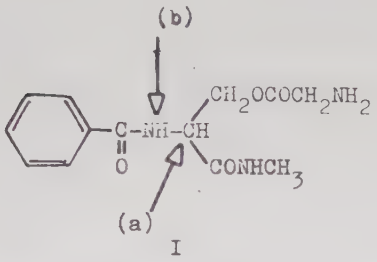
A.Hartmann und J.Pless (9) zeigten, dass sich O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinamid in Wasser mit starken Basen (z.B. KOH) relativ gut zur Umlagerung bringen lässt. Das negative Ergebnis bei Verwendung von 50-proz. wässriger KOH als Umlagerungsmedium deutet darauf hin, dass bei der oben untersuchten Verbindung I die Ausbildung des für die Umlagerung im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt benötigten cyclischen Anions stark erschwert ist. Das Gleichgewicht scheint also weitgehend auf der Seite des offenkettigen Anions zu liegen.



Dazu kommt, dass schon die Bildung des offenkettigen Anions durch die einen +I-Effekt bewirkende Methylgruppe zurückgedrängt wird. Aus diesen Gründen erfolgt in wässrigem Milieu die Verseifung viel schneller als die Umlagerung.

Der im Hinblick auf eine AAE-Reaktion ungünstige Ablauf bei Verwendung von abs. Dimethylformamid/Kalium-tert. butylat könnte durch folgende Faktoren bedingt sein:

1. Die Dissoziation des Protons kann prinzipiell auch an "falscher" Stelle erfolgen und zwar am α-C des Serins (a) oder am benzoylierten α-N (b).



I

2. Die Ablösung des Protons am Amid-Stickstoff wird durch den +I-Effekt der Methylgruppe erschwert.
3. Die zusätzliche Methylgruppe am Amid-Stickstoff bewirkt durch grössere sterische Hinderung einen langsameren Reaktionsablauf, wodurch in vermehrtem Masse solche Nebenreaktionen eintreten, welche bei der Umlagerung des unsubstituierten Amids mit der AAE weniger konkurrieren.

Um die Möglichkeit einer Anionenbildung am α-Stickstoff (1b) des Serins auszuschliessen, wurde als neuer Acceptor die β-Hydroxybuttersäure gewählt. Die entsprechende, am Amidstickstoff nicht substituierte Verbindung kann im Milieu abs. Dimethylformamid/Kalium-tert.butylat relativ gut (Ausbeute 75%) ins AAE-Produkt überführt werden (4).

Zwecks Festlegung präparativ verwendbarer Umlagerungsbedingungen wurde O-Glycyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid · HCl (IIIa) den in Tabelle 2 aufgeführten Reaktionsbedingungen unterworfen.

Tabelle 2

Umlagerungsversuche mit O-Glycyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid IIIa

Reaktionsbedingungen					Chromat. Analyse*
Lösungsmittel	Base		Zeit	Temp.	Umlagerung
DFA	Triaethylamin	10 Aeq.	120'	100°	-
Chloroform	Triaethylamin	4 Aeq.	60'	R'fluss	-
THF	Triaethylamin	4 Aeq.	60'	R'fluss	-
fl.NH_3	$NaNH_2$	4 Aeq.	45'	-70°	-
DFA	$NaNH_2$ pulv.	3 Aeq.	75'	25°	-
THF	$NaNH_2$ pulv.	3 Aeq.	60'	25°	-
tert.Butanol	$NaNH_2$ pulv.	3 Aeq.	60'	25°	-
DFA	Guanidin	3 Aeq.	60'	25°	-
THF	Guanidin	3 Aeq.	60'	25°	-
tert.Butanol	Guanidin	3 Aeq.	60'	25°	-
abs. Methanol	Guanidin	3 Aeq.	30'	25°	-
Wasser	bas.Harz IRA 400	30 Aeq.	60'	25°	-
Wasser	50% KOH	100 Aeq.	4'	-15°	-
DFA	K-tert.Butylat	3 Aeq.	60'	25°	++

*Papierchromatographisch, aufsteigendes Verfahren

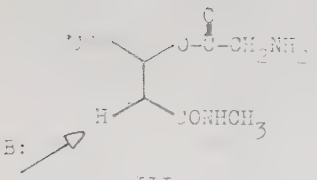
Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, konnte nur im System Dimethylformamid/Kalium-tert. Butylat eine Umlagerung erzielt werden.

Dieses System ergab sich also zwangsläufig als Milieu für einen Versuch in präparativem Masstab (mit 15mMol Ausgangsmaterial). Dabei bildete sich neben dem Umlagerungsprodukt IVa, β-Hydroxybuttersäuremethylamid und Glycin

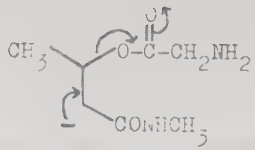
(Spaltprodukte) eine weitere Substanz, die auf dem Papierchromatogramm einen UV-positiven Fleck nahe der Front lieferte. Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei dieser Verbindung um Crotonsäuremethylamid handelte. Zur Aufarbeitung wurde deshalb das Reaktionsgemisch nach dem Ansäuern mit 2N HCl am Hochvakuum bei einer Oelbadtemperatur von 40° sublimiert. Das dabei erhaltene Sublimat entfärbte sowohl Brom wie auch Permanganat und zeigte einen Smp. von 78° - 80°. Der Mischsmp. mit authentischem Material ergab keine Depression; zudem zeigte sich eine völlige Uebereinstimmung der beiden IR-Spektren. Insgesamt liessen sich 12,2% Crotonsäuremethylamid isolieren. Die Trennung des zurückgebliebenen Umlagerungs- bzw. Spaltproduktes gelang durch weiteres Sublimieren bei höherer Temp. (140°). Die Ausbeute an reinem AAE-Produkt β-Hydroxybutyryl-glycinmethylamid (IVa) betrug 10%.

Auf eine Isolierung des Spaltproduktes β-Hydroxy-buttersäuremethylamid wurde verzichtet.

Die Beobachtung, dass die AAE-Reaktion bei O-Glycyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid (IIIa) einzig mit Kalium-tert. Butylat - also in Gegenwart der stärksten aller angewandten Basen - zu einem positiven Resultat führt, könnte ihre Erklärung darin finden, dass die Ausbildung der für die Umlagerung benötigten intermediären Anionen V bzw. VI durch die Methylgruppe erschwert wird. Dadurch können aber Nebenreaktionen in Erscheinung treten, welche bei der Umlagerung des entsprechenden, unsubstituierten Amid-Derivates nicht beobachtet werden (4). Die Bildung von Spaltprodukt und vor allem die Entstehung von Crotonsäuremethylamid bestätigen dies. Das Auftreten des letzteren zeigt auch, dass die Abspaltung des Protons, wie in Punkt 1a postuliert wurde, an "falscher" Stelle, d.h. am α-C erfolgen kann. Der nachstehende Mechanismus erklärt zwangslos die parallel zur Umlagerung ablaufende Eliminierungsreaktion.



IIIa



XI

Der Unterschied in der Ausbeute bei den Umlagerungen von O-Glycyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid (10%) und O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinmethylamid (2%) mag dadurch bedingt sein, dass bei der letztgenannten Verbindung durch die Möglichkeit einer zusätzlichen Anionenbildung am α-N des Serins eine weitere, die Umlagerung konkurrierende Reaktion eintreten kann.

Bei der Diskussion des Einflusses der Methylgruppe am Amidstickstoff in Verbindung IIIa auf die Geschwindigkeit der Umlagerung muss erwogen werden, ob nicht etwa schon durch diese das vorgelagerte Gleichgewicht IIIa⇌V stark nach links verschoben wird, so dass keine genügend

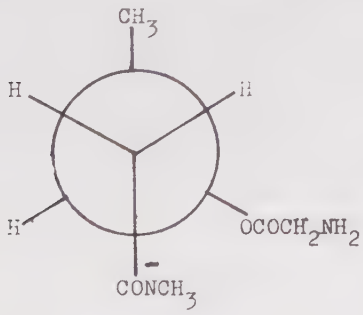
IIIa V

hohe Konzentration an offenkettigem Anion entsteht, und die AAE daher beim Methylamid IIIa schlecht verläuft.

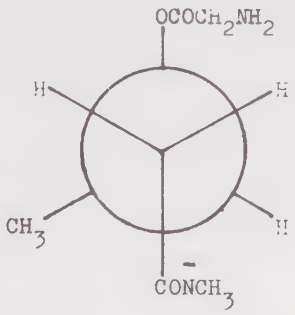
Es ist anzunehmen, dass die Entstehung des offenkettigen Anions V durch die Methylgruppe am Amidstickstoff (im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung) sowohl durch einen sterischen als auch einen induktiven Effekt erschwert wird. - Neben den ungünstigeren statistischen Voraussetzungen für die Dissoziation des Protons (beim Methylamid ist nur ein Wasserstoff, beim Amid dagegen zwei abspaltbar) dürfte nämlich die Annäherung der Base (tert.Butylat) durch die Methylgruppe sterisch gehindert sein. Zudem schwächt der +I-Effekt der Methylgruppe die positive Partialladung auf dem Amidstickstoff in IIIa ab, wodurch die Dissoziation der Methylamidgruppe weniger leicht eintritt. -

Wird hingegen die Umlagerungsgeschwindigkeit durch den zweiten Reaktionsschritt (Bildung des cyclischen Anions VI) begrenzt, so ist der langsamere Verlauf der AAE bei Methylamid im Vergleich zum Amid hauptsächlich sterisch bedingt:

Die Methylgruppe kann den nukleophilen Angriff des negativ geladenen Amidstickstoffs auf das Estercarbonyl erschweren. Betrachtet man nämlich die Konformationen des offenkettigen Anions V am Modell (10), so sieht man deutlich, dass der Angriff nur dann erfolgen kann, wenn die Konformation der in Fig.I dargestellten entspricht.



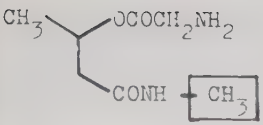
Figur 1



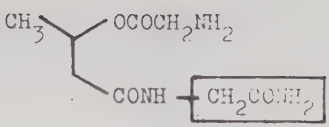
Figur 2

Nach der Konformationsregel für Kohlenstoffketten - hier handelt es sich im speziellen um die α, β -Kohlenstoffbindung der Verbindung V - ist im allgemeinen die gestaffelte (auf Lücke) Konformation, in der die beiden grössten Substituenten gegenüber angeordnet sind, am stabilsten (11). Bei der zur Diskussion stehenden Verbindung sind die beiden grössten Substituenten die $-CO\bar{N}CH_3-$ und die $-OCOCH_2NH_2$-Gruppe. Die gestaffelte Anordnung ist in Figur 2 dargestellt. Wie am Modell leicht feststellbar, ist aber bei dieser bevorzugten Konformation die Ringbildung unmöglich. Es ist ferner ersichtlich, dass beim Vorliegen der für die Cyclisierung erforderlichen Struktur (Fig. 1) sich die von der $-CH_2NH_2-$ und der Amid-Methylgruppe beanspruchten Räume stark überschneiden, wodurch der Uebergang ins cyclische Anion VI natürlich ebenfalls behindert wird. Diese Behinderung, die beim unsubstituierten Amid fast völlig fehlt, lässt auf der andern Seite die Entstehung von Crotonsäuremethylamid XI (Trans-Eliminierung) stärker hervortreten.

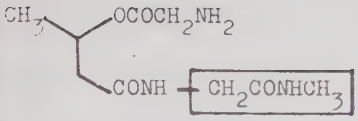
Es bleibt nun immer noch die Frage offen, ob der induktive Effekt des am Amidstickstoff sitzenden Substituenten die Umlagerung massgebend beeinflusst oder nicht. In der Salicoylreihe scheint dies nicht der Fall zu sein (5). Um Einblick in die Verhältnisse im Bereich aliphatischer β-Hydroxsäuren zu gewinnen, wurde das Verhalten in bezug auf die AAE von O-Glycyl-β-hydroxybuttersäureamiden untersucht, die am Amidstickstoff elektronenanziehende Substituenten tragen. Im Hinblick auf eine präparative Verwendung der AAE-Reaktion zur Peptidsynthese war es naheliegend, an Stelle des Methylamins Glycinamid (in IIIb), Glycinmethylamid (in IIIc) und Glycindimethylamid (in IIId) einzusetzen.



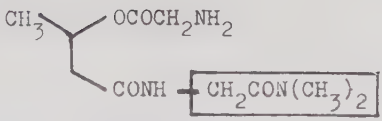
IIIa



IIIb



IIIc



IIId

Formal und im Sinne obiger Ueberlegungen wurden jedoch nicht die Glycinderivate eingeführt, sondern es ist lediglich die CH_3-Gruppe in IIIa durch die verschiedenen Carbonamido-methylgruppen ersetzt worden, wie aus obenstehenden Formeln hervorgeht. Allerdings sind diese Gruppen voluminöser als die Methylgruppe; somit werden die sterischen Verhältnisse noch stärker ins Gewicht fallen.

Die endständige Amid-Gruppierung in IIIb wurde methylsubstituiert um Nebenreaktionen durch "falsche" Anionenbildung am terminalen Amidstickstoff zurückzudrängen (Methylamid IIIc) oder zu verunmöglichen (Dimethylamid IIId). Die Möglichkeit zur Abspaltung eines Protons am α-C des β-Hydroxybutyrylrestes ist auch bei diesen drei Verbindungen vorhanden.

Je 5mMol Ausgangsmaterial IIIb, IIIc, IIId wurden in 75 ml abs. Dimethylformamid gelöst und mit 4 Aequivalenten Kalium-tert.-butylat versetzt. Nach 2 Std. wurden die Reaktionsgemische mit Salzsäure schwach angesäuert, filtriert und im Vakuum eingedampft. Die Trennung erfolgte wiederum an einer Kieselgelsäule, wobei beim Amid IIIb und Methylamid IIIc Chloroform/abs. Methanol (2:1) als Elutions-

mittel diente; beim Dimethylamid IIId dagegen konnte mit gutem Erfolg Chloroform/Isopropanol (2:1) verwendet werden. In Tabelle 3 sind die auf diese Weise isolierten Reaktionsprodukte angegeben.

Tabelle 3

Ausgangsmaterial	AAE-Prod. isoliert	Spaltprod. isoliert	Nebenprodukte isoliert
O-Gly-β-Hybut-GlyNH_2 IIIb	6%	21,2%	Crot-Gly-NH_2 9,9%
O-Gly-β-Hybut-Gly$NHCH_3$ IIIc	8,7%	32,8%	Crot-Gly-$NHCH_3$ 18%
O-Gly-β-Hybut-Gly$N(CH_3)_2$	*	21,3%	Crot-Gly-$N(CH_3)_2$ 24,7% Crot-NH_2 **

* Nur Spuren chromatographisch nachweisbar.

** Einen Hinweis über die mögliche Entstehung dieses Crotonsäureamids findet sich im Original, Seite 36 u. ff.

Die Identifizierung der isolierten Substanzen erfolgte durch Vergleiche mit authentischem Material (Mischsmp., IR-Spektrum und chromatographisches Verhalten).

Die Ergebnisse der in Tabelle 3 aufgeführten Umlagerungsversuche zeigen, dass der Ersatz der Methylgruppe (+I-Effekt) durch Substituenten mit -I-Effekt keine wesentliche Erleichterung der AAE-Reaktion bewirkt. Es scheint, dass die bei der Substitution auftretende Vergrösserung der sterischen Hinderung mehr ins Gewicht fällt

als die durch die gleichen Reste bewirkte Erleichterung der Anionenbildung.

Die in Tabelle 3 angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf isolierte, kristalline Produkte. Da es sich hierbei also nicht um die effektiven Ausbeuten handelt, eignen sie sich nicht besonders gut als Basis einer eingehenderen Diskussion. Dennoch lässt sich der unterschiedliche Einfluss der endständigen Amid-, Methylamid- und Dimethylamid-Gruppierung erkennen und zwar am besten an der Menge der gebildeten (isolierten) Eliminierungsprodukte (Crotonylderivate). Die beobachtete Abstufung der Ausbeuten an Crotonyl-glycinverbindungen mag dadurch gegeben sein, dass die Eliminierung einer geringeren sterischen Beeinflussung durch die zur Diskussion stehenden Substituenten unterliegt als die AAE-Reaktion. Bei zunehmender Methyl-Substitution verschiebt sich dem zu Folge das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten zugunsten der die AAE konkurrierenden Eliminierung. Beim Dimethylamid IIId muss gemäss obiger Ueberlegungen die Umlagerung am schlechtesten verlaufen, und die Eliminierung daher am stärksten hervortreten. Diese Forderung stimmt mit dem experimentellen Befund überein.

Somit erwies sich die Erwartung, dass O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycindimethylamid IIId wegen des Fehlens von Wasserstoff an der endständigen Amidgruppierung - an dieser Stelle keine "falsche" Anionenbildung möglich - am meisten AAE-Produkt liefern würde, als unrichtig.

Tabelle 4

AAE - Versuche in abs. Dimethylformamid als Lösungsmittel und Kalium-tert. Butylat als Base

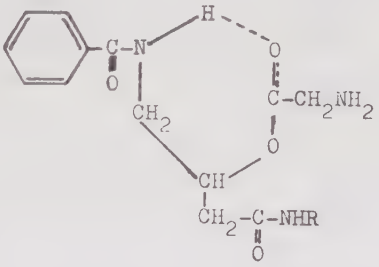
Ausgangsmaterial	Umlagerungsprodukt isoliert	Spaltprodukt isoliert	Nebenprodukte isoliert
O-Gly-N-Bzo-Ser-NH_2 (4)	80%	*	
O-Gly-N-Bzo-Ser-$NHCH_3$	2%	58%	
O-Gly-β-Hybut-NH_2 (4)	70%	*	
O-Gly-(γ-N-Bzo)-β-Hybut-NH_2 (9)	85%	*	
O-Gly-β-Hybut-$NHCH_3$	10%	*	Crot-$NHCH_3$ 12,2%
O-Gly-(γ-N-Bzo)-β-Hybut-$NHCH_3$ (9)	23%	*	
O-Gly-β-Hybut-Gly-NH_2	6%	21,2%	Crot-Gly-NH_2 9,9%
O-Gly-β-Hybut-Gly-$NHCH_3$	8,7%	32,8%	Crot-Gly-$NHCH_3$ 18,0%
O-Gly-β-Hybut-Gly-$N(CH_3)_2$	**	21,3%	Crot-Gly-$N(CH_3)_2$ 24,7% Crot-NH_2 4,5%

*Nur chromatographisch nachgewiesen

**Nur Spuren chromatographisch nachweisbar

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der durchgeführten AAE-Versuche an N-substituierten O-Glycyl-β-hydroxysäureamiden zusammengestellt. Zum Vergleich sind ferner die aus den Diss. von A.Hartmann (4) und J.Pless (9) bekannten Resultate von an analogen Verbindungen ausgeführten Versuchen angegeben.

Beim Vergleich der Buttersäurederivate fällt auf, dass die Ausbeuten an AAE-Produkt bei den beiden Verbindungen, die am γ-Kohlenstoff eine Benzamid-Gruppe tragen, höher sind als bei den entsprechenden unsubstituierten. Dies dürfte auf die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen dem γ-Amidstickstoff und dem Estercarbonyl zurückzuführen sein (9).



Dadurch wird die C=O Doppelbindung im Estercarbonyl stärker polarisiert und die Elektrophilie des Carbonyl-Kohlenstoffatoms erhöht, so dass das Amid-Anion stärker angezogen wird. Daraus resultiert eine Erhöhung der Bildungsgeschwindigkeit des cyclischen Anions und damit auch eine Verbesserung der Ausbeute.

Für die unentwegte Hilfe und das rege Interesse, das Herr Prof.Dr.M.Brenner meiner Arbeit entgegenbrachte, danke ich an dieser Stelle herzlich.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Uebersicht über die verwendeten analytischen Methoden

1. Papierchromatographische Kontrolle

Zur Orientierung über den Verlauf der Reaktionen, zur Identifizierung und zu Reinheitsprüfungen wurde zuerst die Methode der aufsteigenden Chromatographie nach R.J.Williams und H.Kirby (12) benützt. Die besten Resultate lassen sich dabei mit Whatmann-Papier Nr.1 und folgenden Fliessmitteln erzielen:

n-Butanol/Eisessig/Wasser	4:1:1
n-Butanol/Eisessig/Wasser	4:1:5
n-Propanol/Wasser	7:3
sek.Butanol/3-proz. Ammoniak	3:1

Die Sichtbarmachung der Produkte wird wie folgt durchgeführt:

a) Betrachten im UV-Licht

b) Entwickeln mit Ninhydrin (Freie Aminogruppen)

c) Chlorieren und anschliessendes Entwickeln mit o-Tolidin-Kaliumjodid nach F.Reindel und W.Hoppe (13). Die Chlorierung wird in einer mit Chlorgas gesättigten Kammer ausgeführt. Dauer 10 - 12 Minuten. (Aminosäuren, Peptide und deren N-Acylderivate).

d) Besprühen mit verdunnter, wässriger Permanganatlösung (aliphatische Doppelbindungen).

2. Dünnschicht-chromatographische Kontrolle

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde die Papierchromatographie allmählich durch die Dünnschichtchromatographie nach E.Stahl (14), in der modifizierten Arbeitsweise von M.Brenner und A.Niederwieser (15) ersetzt. Der Vorteil besteht vor allem darin, dass bei bedeutend kürzeren Laufzeiten bessere

Trennungen erfolgen.

Zum Nachweis der Produkte benützt man die gleichen Reagentien wie bei der Papierchromatographie. Absorbieren oder fluoreszieren die Substanzen im UV-Licht, so arbeitet man am besten mit zinksilikathaltigen Sorptionsschichten (16). Betrachtet man dann die Platten im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 mμ, so wird die Schicht durch Fluoreszenz aufgehellt. Dadurch werden Verbindungen sichtbar, die im normalen UV-Licht nicht erkennbar sind.

Als Fliessmittel eignen sich hier besonders:

Propanol/Wasser	7:3
n-Butanol/Eisessig/Wasser	4:1:1
Chloroform/Methanol	2:1
Chloroform/Isopropanol	3:1
Chloroform/tert.Butanol	2:1
Chloroform/Benzol/Methanol	5:5:2

3. IR-Spektroskopische Kontrolle

Zum Nachweis funktioneller Gruppen (vor allem $>C=C<$) und zur Identifizierung von Reaktionsprodukten eignet sich das IR-Spektrum gut. Die Identität wird mit einem auf anderem Wege hergestellten Vergleichspräparat bestätigt. Mit andern Nachweismethoden zusammen ergibt das Spektrum somit eindeutige Resultate.

Die Schmelz- und Mischschmelzpunkte sind, wenn nichts anderes vermerkt, auf einem Koffler-Block bestimmt worden (unkorrigiert). Die Analysensubstanzen wurden 15 Stunden im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet, wobei die Temperatur immer ca. 50° unter dem Schmelzpunkt der Substanz lag, jedoch nie mehr als 90° betrug.

B. Allgemeine Vorschriften

1. Lösungsmittel

Als Lösungsmittel für die Papier-, Dünnschicht- und Säulenchromatographie sowie für die Kristallisation der Analysenproben wurden Produkte der Firma E.Merck (für Analyse und für Chromatographie) und Fluka (puriss) verwendet.

2. Veresterung mit Diazomethan

Die zu veresternde Säure wird in wenig absolutem Methanol gelöst und unter Rühren bei 0 - 5° mit aetherischer Diazomethanlösung (17) zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum bleibt der Methylester als hellgelbes Oel in quantitativer Ausbeute zurück. Dieses wird ohne vorherige Kristallisation direkt in die nächste Reaktion eingesetzt.

3. Methylaminolyse von Estern

Der entsprechende Ester (Methyl- oder Aethyl-) wird als Oel direkt - liegt er in kristalliner Form vor, so werden die Kristalle in einem Minimum absolutem Aethanol gelöst - mit einem 6-fachen Ueberschuss an 33-proz. alkoholischer Methylaminolösung versetzt. In einem verschlossenen Gefäss lässt man das Reaktionsgemisch 1 - 2 Tage bei ca. 37° stehen. Der nach dem Eindampfen im Vakuum verbleibende kristalline Rückstand wird aus einem geeigneten Lösungsmittel (meist abs. Aethanol) umkristallisiert. Ausbeute: 80 - 90%.

4. O-Acylierungen von Hydroxyverbindungen

a) Nach der "Phosgenmethode" (18)

Zu einer Lösung von 10 mMol Cbzo-Aminosäure und 11 mMol Triaethylamin in 15-20 ml abs. Tetrahydrofuran fügt man bei -70° 14 mMol Phosgen in Toluol (2 bis 2,5 mMol Phosgen/ml Toluol) zu. Es fällt sofort Triaethylaminhydrochlorid aus. Nach 15-20 Minuten wird die vorgekühlte Lösung der zu acylierenden Komponente (5-7,5 mMol) in 7,5-10 ml abs. Pyridin zugesetzt. Pyridinunlösliche Substanzen bringt man am besten durch Zugabe von Dimethylformamid in Lösung.

Nach gutem Durchmischen entfernt man das Kältebad und lässt das Reaktionsgemisch über Nacht bei 0° stehen.

Aufarbeitung der Neutralkörper

Die leichtflüchtigen Anteile des meist stark gefärbten Reaktionsgemisches werden im Vakuum bei 40° Badtemperatur entfernt und der ölige Rückstand zwischen Essigester und 2N HCl verteilt. Die Essigesterlösung wird mit 2N HCl, danach mit 10-proz. Kaliumbicarbonatlösung extrahiert, mit Wasser neutral gewaschen und zum Schluss ein bis zweimal mit gesättigter Kochsalzlösung geschüttelt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat sicc. wird der Essigester im Vakuum verdampft und der meist ölige Rückstand mit einem geeigneten Lösungsmittel zur Kristallisation gebracht.

Bei gefärbten Essigesterlösungen empfiehlt es sich, diese nach der Extraktion mit Natriumsulfat und Tierkohle zu schütteln. Die Tierkohle ist vorher gründlich mit Essigester zu waschen. Auf diese Weise erzielt man eine erhebliche Entfärbung der Lösung.

b) Nach der modifizierten Sulfochlorid-Methode (9),(19)

Man löst 10 mMol Cbzo-Aminosäure in 15 - 20 ml abs. Tetrahydrofuran und 20 mMol abs. Pyridin oder Triaethylamin, kühlt auf -40 bis -50° ab und lässt unter Schütteln langsam 10 mMol Benzolsulfochlorid in abs. Tetrahydrofuran zutropfen. Nach 15 Minuten wird eine vorgekühlte Lösung von 5 mMol Hydroxyverbindung in abs. Pyridin (eventuell unter Zusatz von Dimethylformamid) zugesetzt. Das Kältebad wird entfernt, die Lösung gut durchmischt und über Nacht bei 0° aufbewahrt. Zur Aufarbeitung werden die leichtflüchtigen Anteile im Vakuum bei 40° entfernt, der meist gefärbte Rückstand zwischen Essigester/2N HCl verteilt und wie üblich aufgearbeitet.

5. Abspaltung der Cbzo-Schutzgruppe

10 mMol Carbobenzoxy-Verbindung werden in 50 ml Aethanol gelöst, 10,5 ml 1N HCl und 500 mg 10-proz. Pd-Kohle zugegeben und bei Raumtemp. solange mit Wasserstoff behandelt, bis kein CO_2 mehr nachgewiesen werden kann. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators dampft man die Lösung im Vakuum bei 40° Badtemperatur ein und trocknet den verbleibenden Rückstand während mehreren Stunden im Exsiccator über P_2O_5. Das meistens als Oel ausfallende Hydrochlorid kristallisiert man aus abs. Methanol/Aether.

Tabelle 5

Ausgangsmaterialien

Nr.	Verbindung	Krist. aus	Smp. bzw. Sdp.
1	N-Benzoyl-DL-serinmethylamid	abs. EtOH	148 - 149°
2	O-(Cbzo-Glycyl)-N-benzoyl-DL-serinmethylamid	Aceton/P.Aether	140 - 146°
I	O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinmethylamid · HCl	abs.MeOH/Aether	174 - 176°
3	β-Hydroxybuttersäuremethylamid	-	111 - 112°/0,35
4	O-Azidoacetyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid	-	gelbe Fl.keit
IIIa	O-Glycyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid · HCl	abs.MeOH/Aether	148 - 150°
5	β-Hydroxybutyryl-glycinaethylester	-	gelbe Fl.keit
6	β-Hydroxybutyryl-glycinamid	Aceton+EtOH	111 - 112°
7	O-(Cbzo-Glycyl)-β-hydroxybutyryl-glycinamid	MeOH/Aether	138 - 140°
IIIb	O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycinamid · HCl	abs.MeOH/Aether	179 - 181°
8	β-Hydroxybutyryl-glycinmethylamid	Aceton	117 - 118°
9	O-(Cbzo-Glycyl)-β-hydroxybutyryl-glycinmethylamid	Essigester	126 - 128°
IIIc	O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycinmethylamid · HCl	abs.MeOH/Aether	197 - 199°
10	β-Hydroxybutyryl-glycindimethylamid	$CHCl_3$/P.Aether	151 - 154°/0,1 74 - 76°
11	O-(Cbzo-Glycyl)-β-hydroxybutyryl-glycindimethylamid	Essigester	128 - 130°
IIId	O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycindimethylamid · HCl	abs.MeOH/Aether	167 - 170°

C. Synthese der Ausgangsmaterialien

O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinmethylamid · HCl I

N-Benzoyl-DL-serinmethylamid 1

N-Benzoyl-DL-serin (20) wird mit Diazomethan verestert und anschliessend der Methylaminolyse unterworfen.
Ausbeute: 84% Smp. 148 - 149° (abs.EtOH).

$C_{11}H_{14}N_2O_3$	Ber:	C 59,44	H 6,35	N 12,61	O 21,60%
(222,24)	Gef:	C 59,30	H 6,54	N 12,67	O 21,50%

O-(Cbzo-Glycyl)-N-benzoyl-DL-serinmethylamid 2

a) Nach der "Phosgenmethode" (18)

Das nach dieser Methode entstehende Produkt kann nur als gelbes Oel gefasst werden; es wird direkt hydriert.

b) Nach der modifizierten Sulfochlorid Methode (9),(19)

Im Gegensatz zur "Phosgenmethode" bleibt hier nach der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches nur ein schwach gelb gefärbtes Oel zurück, das aus Aceton/Petrolaether kristallisiert wird.
Ausbeute: 87% Smp. 135 - 142°

Nach nochmaligem Umkristallisieren schmilzt die Substanz bei 140 - 146°

O-Glycyl-N-benzoyl-DL-serinmethylamid · HCl I

Smp. 174 - 176° (abs. Methanol/Aether).

$C_{13}H_{18}N_3O_4Cl$	Ber:	C 49,45	H 5,75	N 13,30	O 20,27	Cl 11,23%
(315,755)	Gef:	C 49,50	H 5,97	N 13,51	O 20,28	Cl 11,17%

Das aus a) nach der Hydrierung erhaltene Hydrochlorid besitzt nach zweimaligem Umkristallisieren einen Schmelzpunkt von 173 - 174° und ist gemäss Mischschmelzpunkt mit dem aus b) gewonnenen Produkt identisch.

O-Glycyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid · HCl IIIa

β-Hydroxybuttersäuremethylamid 3

Hergestellt aus β-Hydroxybuttersäuremethylester und alkoholischer Methylaminlösung.

Sdp. 109 - 112°/0,3mm Ausbeute: 80%

Zur Analyse wird ein Teil nochmals destilliert.

Sdp. 111 - 112°/0,35 mm

$C_5H_{11}NO_2$	Ber.	C 51,26	H 9,46	N 11,96%
(117,146)	Gef.	C 50,96	H 9,57	N 12,04%

O-Azidoacetyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid 4

Die Darstellung dieser Verbindung erfolgt analog dem von E.D.Nicolaides et al. (21) beschriebenen O-Azidoacetyl-N-carbobenzoxy-DL-serin. - Nach der Aufarbeitung erhält man das Produkt als gelbe Flüssigkeit, die direkt weiter verwendet wird.

O-Glycyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid · HCl IIIa

a) β-Naphthalinsulfonat

4 g (20 mMol) des obigen Rohproduktes werden in 50 ml Eisessig gelöst, 5,75 g (22 mMol) β-Naphthalinsulfonsäure 3 H_2O und 500 mg 10-proz. Pd-Kohle zugegeben und während 3½ Stunden Wasserstoff durchgeleitet. Der Katalysator wird abfiltriert, der Eisessig im Vakuum entfernt und das zurückbleibende Oel im Exsiccator über KOH getrocknet.

Nach dem Kristallisieren aus Methanol/Aether erhält man das β-Naphthalinsulfonat in weissen Kristallen vom Smp. 155 - 156°. Die Ausbeute beträgt 3g (40%).

Zur Analyse wird ein Teil nochmals aus den gleichen Lösungsmitteln umkristallisiert. Smp. 156 - 157°

$C_{17}H_{22}N_2O_6S$	Ber.	C 53,40	H 5,80	N 7,33%
(382,422)	Gef.	C 53,36	H 5,98	N 7,51%

b) Hydrochlorid

Man fügt zu einer Lösung von O-Glycyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid-β-naphthalinsulfonat in abs. Methanol eine aequivalente Menge Bariumchlorid. Nach gutem Durchmischen lässt man das Reaktionsgemisch über Nacht bei 0° stehen und zentrifugiert hierauf das ausgefallene Barium-β-naphthalinsulfonat in der Kälte ab. Die überstehende Lösung engt man im Vakuum ein, filtriert wenn nötig durch ein Faltenfilter und versetzt das Filtrat mit Aether. Das Hydrochlorid kristallisiert in weissen Kristallen vom Schmelzpunkt 148 - 150°. Ausbeute: 65%.

$C_7H_{15}N_2O_3Cl$	Ber.	C 39,90	H 7,18%	
(210,663)	Gef.	C 40,15	H 7,34%	

Hat man auf diese Art reines Hydrochlorid (Impfkristalle) erhalten, so wird der Rest des Rohproduktes an O-Azidoacetyl-β-hydroxybuttersäuremethylamid direkt durch Hydrierung ins Hydrochlorid übergeführt.

O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycinamid · HCl IIIb

β-Hydroxybutyryl-glycinaethylester 5

Man löst 23,6g (200 mMol) β-Hydroxybuttersäurehydrazid (2) in 100 ml 2N HCl, kühlt auf -5 bis -10° ab und lässt unter Rühren 17,2g (250 mMol) Natriumnitrit in 30 ml Wasser

zutropfen. Zur resultierenden wässrigen Azidlösung fügt man nun 28g (200mMol) festes Glycinaethylester-hydrochlorid und bringt die Lösung durch Zutropfen von 2N Sodalösung auf einen pH von 9. Man lässt während 2½ Stunden bei Zimmertemperatur rühren und säuert dann mit Salzsäure 1:1 bis zur sauren Reaktion gegen Kongorot an. Nach weiteren 30 Min. Rühren wird die saure Lösung erschöpfend mit Essigester extrahiert und die vereinigten Fraktionen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels bleibt der Ester als gelbe Flüssigkeit zurück; 22,8g (62%).

β-Hydroxybutyryl-glycinamid 6

Man löst 15,4g (81,5 mMol) rohen β-Hydroxybutyryl-glycinaethylester in 100 ml abs. Methanol, leitet bei 0° unter Feuchtigkeitsausschluss trockenes Ammoniakgas bis zur Sättigung ein und lässt das Gemisch 2 Tage bei Zimmertemperatur verschlossen stehen. Das nach dem Eindampfen im Vakuum zurückbleibende gelbe Oel wird aus heissem Aceton unter Zusatz von Alkohol kristallisiert.
Smp: 111 - 112°. Ausbeute: 10g.

Aus der Mutterlauge lässt sich noch 1g der Substanz vom Smp: 107 - 113° isolieren.

Totalausbeute: 11g (84,5%).

O-(Cbzo-Glycyl-)β-hydroxybutyryl-glycinamid 7

Die Darstellung erfolgt nach der modifizierten Sulfochlorid-Methode: (9),(19).
Smp. 138 - 140° (Methanol/Aether). Ausbeute: 68%.

$C_{16}H_{21}N_3O_6$	Ber:	C 54,69	H 6,02%
(351,352)	Gef:	C 54,65	H 6,13%

O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycinamid · HCl IIIb

Das nach der Hydrierung resultierende hellgelbe Oel wird mit einem Gemisch von warmem Isopropanol/Aethanol 1:1 verrieben. Nach einiger Zeit beginnt das Oel langsam zu kristallisieren. Durch Umkristallisieren aus Methanol/Aether erhält man das Hydrochlorid in einer Ausbeute von 90,5% vom Smp. 179 - 181°

$C_8H_{16}N_3O_4Cl$	Ber:	C 37,87	H 6,36	O 25,23%
(253,689)	Gef:	C 38,04	H 6,56	O 25,15%

O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycinmethylamid · HCl IIIc

β-Hydroxybutyryl-glycinmethylamid 8

Aus rohem β-Hydroxybutyryl-glycinaethylester und Methylamin. Das als Rückstand verbleibende Oel wird im Exsiccator über P_2O_5 getrocknet; dabei kristallisiert das Oel nach einiger Zeit aus. Zur Reinigung wird es aus Aceton umkristallisiert. Smp. 117 - 118°.

Die Mutterlauge engt man ein und kristallisiert deren Rückstand aus Aceton/Aether. Smp. 114 - 117°
Totalausbeute: 81%

$C_7H_{14}N_2O_3$	Ber:	C 48,26	H 8,10	N 16,08	O 27,55%
(174,198)	Gef:	C 48,48	H 8,22	N 16,26	O 27,77%

O-(Cbzo-Glycyl)-β-hydroxybutyryl-glycinmethylamid 9

Die Herstellung dieser Verbindung erfolgt nach der modifizierten Sulfochlorid-Methode (9),(19).
Smp. 126 - 128° (Essigester). Ausbeute: (60,5%).

Zur Analyse wird ein Teil aus Aceton umkristallisiert.

$C_{17}H_{23}N_3O_6$	Ber:	C 55,88	H 6,35%
(365,378)	Gef:	C 55,91	H 6,49%

O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycinmethylamid · HCl IIIc

Smp. 197 - 199°. Methanol/Aether. Ausbeute: 90,5%

$C_9H_{18}N_3O_4Cl$	Ber:	C 40,37	H 6,78	O 23,91%
(267,715)	Gef:	C 40,22	H 7,08	O 24,00%

O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycindimethylamid IIId

β-Hydroxybutyryl-glycindimethylamid 10

Man versetzt 22,8g (120 mMol) rohen β-Hydroxybutyryl-glycinaethylester mit 130 ml 33-proz. alkoholischer Dimethylaminlösung und lässt dieses Gemisch verschlossen 2 Tage bei 37° stehen. Nach dem Eindampfen im Vakuum bleibt ein dunkelgelbes Oel als Rückstand, das man im Hochvakuum bei einer Oelbadtemperatur von 180 - 190° destilliert. Hellgelbes Oel. Sdp. 151 - 154°/$_{0,1mm}$. Ausbeute: 11g (49%).

Nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur beginnt das Dimethylamid zu kristallisieren. Es wird aus Chloroform/Petrolaether umkristallisiert. Smp. 74 - 76°.

Zur Analyse wird nochmals umkristallisiert und die Substanz 14 Stunden bei 25° im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.

$C_8H_{16}N_2O_3$	Ber:	C 51,05	H 8,57	N 14,88	O 25,50%
(188,224)	Gef:	C 51,04	H 8,79	N 14,62	O 25,66%

O-(Cbzo-Glycyl)-β-hydroxybutyryl-glycindimethylamid · HCl 11

Die Darstellung dieser Substanz erfolgt ebenfalls nach der modifizierten Sulfochlorid-Methode (9),(19). Smp. 128 - 130° (Essigester). Ausbeute: 77%.

$C_{18}H_{25}N_3O_6$	Ber:	C 56,98	H 6,64%
(379,404)	Gef:	C 57,02	H 6,69%

O-Glycyl-β-hydroxybutyryl-glycindimethylamid HCl IIId

Smp. 167 - 170°, Methanol/Aether. Ausbeute: 85%.

$C_{10}H_{20}N_3O_4Cl$	Ber:	C 42,63	H 7,16	O 22,72%
(281,741)	Gef:	C 42,58	H 7,41	O 22,61%

B. Umlagerungsversuche mit Kalium-tert.butylat in abs. Dimethylformamid

Man fügt jeweils zu 3,62 mMol Ausgangsmaterial, gelöst in 50 ml abs. Dimethylformamid, 14ml 1,025N (14,35 mMol) Kalium-tert.butylat und lässt nach gutem Durchmischen 2½ Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Danach säuert man die Lösung mit 10,8 ml 1N Hcl schwach an, filtriert vom ausgeschiedenen Kaliumchlorid ab und chromatographiert die hellgelbe Lösung auf Dünnschicht (15).

Aufarbeitung

Zur Trennung der verschiedenen Reaktionsprodukte wird das Gemisch auf einer Kieselgel-Säule chromatographiert.

100g Kieselgel 0,2 - 0,5mm der Firma Merck werden in einem Erlenmeyer-Kolben mit den jeweils bei der Dünnschichtchromatographie als Fliessmittel verwendeten Lösungsmitteln versetzt und nach gutem Durchmischen in die Säule gegeben. Nun wäscht man die gefüllte Säule mit genügend Chloroform stab.

Die nach dem Ansäuern filtrierte Lösung dampft man im Vakuum ein, nimmt den Rückstand in abs. Methanol auf und filtriert von eventuell Ungelöstem ab. Die klare Lösung versetzt man mit 2-3g Kieselgel unter 0,08mm (Merck), dampft im Vakuum sorgfältig ein und trocknet die nun auf dem Kieselgel adsorbierten Substanzen im Exsiccator über Phosphorpentoxyd.

Das solchermassen präparierte Reaktionsgemisch bringt man auf die Säule und eluiert mit dem gleichen Lösungsmittel, die bei der Dünnschichtchromatographie als Fliessmittel dienten. Am besten arbeitet man mit einem Fraktionensammler, wobei die Tropfenzahl so gewählt wird, dass pro Fraktion ungefähr 12-15ml Eluat aufgefangen werden. Die Tropfgeschwindigkeit sollte dabei nicht grösser als ein Tropfen pro Sekunde sein. Den Verlauf der Trennung verfolgt man durch Dünnschichtchromatographie jeder einzelnen Fraktion.

Die zusammengehörenden Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die zum Teil kristallinen Rückstände werden aus den entsprechenden Lösungsmitteln kristallisiert.

Tabelle 6

Vergleichssubstanzen

Nr.	Verbindung	Krist. aus	Smp. bzw. Sdp.
I	N-Benzoyl-DL-seryl-glycin-aethylester	abs. EtOH/Aether	123 - 125°
II	N-Benzoyl-DL-seryl-glycin-methylamid	EtOH	184 - 187°
IVa	β-Hydroxybutyryl-glycin-methylamid	Aceton	117 - 118°
XI	Crotonsäuremethylamid	Aceton/P.Aether	sublimiert bei 50° im H.V 79 - 80°
2	β-Hydroxybutyryl-glycin-hydrazid	abs.MeOH	115 - 117°
3	β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycinaethylester	Essigester	101 - 104°
IVb	β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycinamid	abs.MeOH	169 - 171°
4	Crotonyl-glycinamid	Aceton/Aether	174 - 176°
IVc	β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycinmethylamid	EtOH	197 - 200°
5	Crotonyl-glycinmethylamid	Essigester	162 - 163°
IVd	β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycindimethylamid	$CHCl_3$/P.Aether	105 - 106°
6	Crotonyl-glycindimethylamid	$CHCl_3$/P.Aether	147 - 149°

D. Synthese der Vergleichssubstanzen

N-Benzoyl-Dl-seryl-glycinmethylamid II

N-Benzoyl-DL-seryl-glycinaethylester 1

Man suspendiert bei 0° unter Ausschluss von Feuchtigkeit 2,16g (15,4 mMol) fein pulverisiertes Glycinaethylester Hydrochlorid in 13 ml Methylenchlorid und erhält durch Zugabe von 2,2 ml (15,4 mMol) Triaethylamin den Ester als freie Base. Es fällt Triaethylamin · HCl aus. Nach 15 Min. werden 15,4 mMol N-Benzoyl-DL-serinazid gelöst in 100 ml Essigester zugegeben, die Reaktionslösung mit Triaethylamin alkalisch gemacht und das Ganze über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Lösung giesst man alsdann in einen Scheidetrichter, gibt genügend Essigester zu und arbeitet normal auf. Als Rückstand verbleibt ein hellgelbes Oel, das aus abs. Aethanol/Aether kristallisiert wird. Smp. 123 - 125°, Ausbeute: 0,85g (37%).

$C_{14}H_{18}N_2O_5$	Ber:	C 57,13	H 6,17	N 9,52	O 27,18%
(294,3)	Gef:	C 57,06	H 6,34	N 9,70	O 27,17%

N-Benzoyl-DL-seryl-glycinmethylamid II

Smp. 184 - 187° (Aethanol) Ausbeute: 81%

$C_{13}H_{17}N_3O_4$	Ber:	C 55,90	H 6,14	N 15,05	O 22,92%
(279,29)	Gef:	C 56,16	H 6,31	N 14,79	O 22,92%

β-Hydroxybutyryl-glycinmethylamid IVa

Herstellung siehe Seite 29, Nr. 8

Crotonsäuremethylamid XI

Die Darstellung dieser Verbindung erfolgt nach der Methode der gemischten Anhydride: (22,23,24):

Zu einer Lösung von 1,72g (20 mMol) Crotonsäure und 2,8 ml (20 mMol) Triaethylamin in 50 ml abs. Tetrahydrofuran fügt man bei 0° 1,92 ml (20 mMol) Chlorameisensäureaethylester. Nach 10 Minuten gibt man 1,35g (20 mMol) Methylaminhydrochlorid in 20 ml 1N Natronlauge zu und lässt das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum bei einer Badtemperatur von 30 - 35° und sublimiert den Rückstand im Hochvakuum bei ca. 50°. Die sich abscheidenden Kristalle werden nochmals sublimiert und dann aus Aether/Petrolaether kristallisiert. Smp. 79 - 80°, Ausbeute: 730 mg (33,3%).

Zur Analyse wird ein Teil 40 Stunden bei 22° im Vakuumexsiccator getrocknet (12 mm Hg).

C_5H_9NO	Ber:	C 60,58	H 9,15	N 14,13%
(99,13)	Gef:	C 60,34	H 9,27	N 14,25%

β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycinamid IVb

β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycinaethylester 3

a) β-Hydroxybutyryl-glycinhydrazid 2

13,8g (73 mMol) roher β-Hydroxybutyryl-glycinaethylester werden in 30 ml abs. Methanol gelöst, mit einem 1,5-fachen Ueberschuss an Hydrazinhydrat versetzt und 1 Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen lässt man das Hydrazid über Nacht bei 0° kristallisieren.
Smp. 115 - 117°, Ausbeute: 9,6g.

Die Mutterlauge wird eingeengt und mit Aethanol/Aether versetzt, wobei man weitere 1,1g Hydrazid vom Smp. 119 - 120° erhält. Totalausbeute: 10,7g (84%).

b) β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycinaethylester 3

Man löst 7,8g (44mMol) β-Hydroxybutyryl-glycinhydrazid in 22,5 ml 2N HCl, kühlt auf 0° ab und gibt eine Lösung von 4,5g (65 mMol) Natriumnitrit in 10 ml Wasser zu. Nun fügt man zur resultierenden wässrigen Azidlösung 6,2g (44,5 mMol) festes Glycinaethylester · HCl und lässt bei 0° unter Rühren langsam 2N Natronlauge zutropfen, bis die Lösung ein pH von ca. 8 (mit Brilliant-Papier kontrollieren) erreicht hat. Man rührt bei Zimmertemperatur 25 Minuten weiter, säuert dann mit HCl 1:1 auf pH 5 an, und extrahiert die Lösung mit Essigester im Kutscher-Steudelapparat während 5 Stunden. Die Essigester-Fraktion wird kurz über Natriumsulfat getrocknet und dann im Vakuum eingedampft. Den Rückstand kristallisiert man aus Essigester um. Smp. 100 - 106°, Ausbeute: 4,6g (42%).

Zur Analyse wird ein Teil nochmals umkristallisiert. (Smp. 101 - 104°).

$C_{10}H_{18}N_2O_5$	Ber:	C 48,77	H 7,37%
(246,26)	Gef:	C 49,02	H 7,57%

β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycinamid IVb

Man sättigt eine Lösung von 0,6g (2,4 mMol) Ester in 15 ml abs. Methanol bei 0° mit trockenem Ammoniak und lässt verschlossen 1½ Tage bei Zimmertemperatur stehen. Das Amid, das während dieser Zeit zum grössten Teil ausfällt, wird abgenutscht, mit Aethanol/Aether (1:1) gewaschen und im Exsiccator über P_2O_5 getrocknet.
Smp. 167 - 172°, Ausbeute: 0,45g.

Die Mutterlauge wird eingeengt und der Rückstand aus Aethanol/Aether kristallisiert. Smp. 166 - 171° (50mg), Totalausbeute: 0,5g (94,5%).

Zur Analyse wird ein Teil aus abs. Methanol umkristallisiert. Smp. 169 - 171°.

$C_8H_{15}N_3O_4$	Ber:	C 44,23	H 6,96	O 29,46%
(217,224)	Gef:	C 44,47	H 6,98	O 29,55%

Crotonyl-glycinamid 4

Man fügt zu 15 mMol Crotonsäureanhydrid in 20 ml abs. Tetrahydrofuran bei 0° eine Lösung von 15 mMol Glycinamid HCl in 14,5 ml 1N kalter NaOH. Nach gutem Durchmischen gibt man weitere 14,5 ml 1N NaOH zu und lässt 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Nach dem Verdampfen des Tetrahydrofurans stellt man die wässrige Lösung mit 2N Sodalösung auf pH 8 - 9, sättigt mit Kochsalz und extrahiert mit Essigester 4 Stunden im Kutscher-Steudelapparat. Man dampft im Vakuum ein und kristallisiert den Rückstand aus Aceton/Aether. Smp. 174 - 176°.

$C_6H_{10}N_2O_2$	Ber:	C 50,69	H 7,09	N 19,71%
(142,156)	Gef:	C 50,69	H 7,08	N 19,41%

β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycinmethylamid IVe

Aus β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycin-aethylester und alkoholischer Methylaminlösung.
Smp. 197 - 200° (Aethanol).

Die Mutterlauge wird eingedampft und der Rückstand aus Aethanol/Aether kristallisiert. Smp. 195 - 199°.
Totalausbeute: 98,5%

$C_9H_{17}N_3O_4$	Ber:	C 46,74	H 7,41	N 18,17	O 27,68%
(231,25)	Gef:	C 46,79	H 7,60	N 18,05	O 27,85%

Crotonyl-glycinmethylamid 5

Die Herstellung dieses Methylamids erfolgt analog der Amid-Methode aus Crotonsäureanhydrid und Glycinmethyl-

amid · HCl. Smp. 158 - 160° (Chloroform/Aether).

Zur Analyse wird ein Teil aus Essigester umkristallisiert. Smp. 162 - 163°.

$C_7H_{12}N_2O_2$	Ber:	C 53,83	H 7,74	N 17,94%
(156,182)	Gef:	C 54,06	H 7,95	N 17,81%

β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycindimethylamid IVd

Man fügt zu einer Lösung von 4,6g (18,7 mMol) β-Hydroxybutyryl-glycyl-glycinaethylester in 25 ml abs. Aethanol 22 ml einer 33-proz. alkoholischen Dimethylaminlösung. Nach 2-tägigem Stehen bei 37° werden die leichtflüchtigen Anteile im Vakuum entfernt. Zurück bleibt ein gelbes Oel, das bei Chromatographieren auf Dünnschicht in Propanol/Wasser (7:3) als Fliessmittel zwei Hauptflecken ergibt (Ester und Dimethylamid). Zur Isolierung des gewünschten Produktes wird ein Teil des Oeles auf neutralem Alox chromatographiert (25), wobei die Eluierung mit Aether begonnen wird. Den Verlauf der Trennung auf der Säule verfolgt man mittels Dünnschicht-Chromatographie. Die zusammengehörenden Fraktionen werden vereinigt, eingedampft und aus Chloroform/Petrolaether kristallisiert.

Smp. 97 - 101°. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus den gleichen Lösungsmitteln erhöht sich der Smp. auf 105 - 106°.

$C_{10}H_{19}N_3O_4$	Ber:	C 48,96	H 7,81	N 17,13 O 0 26,09%
(245,276)	Gef:	C 49,05	H 7,93	N 16,87 O 25,99%

Crotonyl-glycindimethylamid 6

Die Herstellung dieser Verbindung erfolgt ebenfalls analog dem Amidderivat aus Crotonsäureanhydrid und Glycindimethylamid · HCl (26). Smp. 147 - 149° (Chloroform/Petrolaether).

$C_8H_{14}N_2O_2$	Ber:	C 56,45	H 8,29	N 16,46%
(170,208)	Gef:	C 56,51	H 8,29	N 16,50%

Literatur

(1) J.P.Zimmermann, Diss. Basel 1952

(2) M.Brenner et al., Helv.Chim.Acta 40, 1497, (1957)

(3) M.Brenner und W.Hofer, Helv.Chim.Acta 44, 1796, (1961)

(4) A.Hartmann, Diss. Basel 1957

(5) W.Schneider, Diss. Basel 1958

(6) Th.Wieland, Diskussionsbeitrag zu Referat M.Brenner Coll.Czech.Chem.Comm.Spec.Issue 24, 138, (1958)

(7) L.A.Cohen und B.Witkop, Angew.Chem. 73, 264 - 265, (1961)

(8) J.P.Zimmermann, unveröffentlicht

(9) J.Pless, Diss. Basel 1960

(10) Dreiding-Modell der Firma W.Büchi, Flawil SG

(11) z.B. H.H.Lau, Angew.Chem. 73, 423, (1961)

(12) R.J.Williams und H.Kirby, Science 107, 481, (1948)

(13) F.Reindel und W.Hoppe, Chem.Ber. 87, 1103, (1954)

(14) E.Stahl, Pharmazie 11, 633, (1956)

(15) M.Brenner und A.Niederwieser, Experientia 16, 378, (1960)

(16) M.Brenner et al., Experientia 17, 145, (1961)

(17) Neuere Methoden der präp.organ.Chemie, Berlin 1944, 397

(18) M.Brenner et al., Helv.Chim.Acta 40, 604, (1957)

(19) J.Pless und H.Moser, Chimia 14, 377, (1960)

(20) S.P.L. Sörensen und A.C.Anderson, Z.Physiol.Chem. 56, 297, (1908)

(21) E.D.Nicolaides, R.D.Westland und E.L.Wittle, J.Am.Chem. Soc. 76, 2884, (1954)

(22) Th.Wieland und H.Bernhard, Ann. 572, 190, (1951)

(23) R.A.Boissonnas, Helv.Chim.Acta 34, 874, (1951)

(24) J.R.Vaughan und R.L.Osato, J.Am.Chem.Soc. 74, 676, (1952)

(25) Vergl. E.Hardegger, Einführung in das organ.chem.Praktikum Zürich 1957, Seite 44

(26) W.B.Hanby et al., J.Chem.Soc. 1950, 3009

Curriculum vitae

Ich, Hans Moser, wurde als Sohn des Hans Moser, Arzt, von Ruswil und Hitzkirch und der Else, geb. Hamann, am 7.Juni 1932 als Bürger von Ruswil und Hitzkirch in Basel geboren.

In Basel besuchte ich die Primarschule und die ersten Klassen des Humanistischen Gymnasiums. Nach zweijährigem Besuch der Stiftsschule Einsiedeln trat ich ins Kollegium Schwyz ein, wo ich im Sommer 1952 die Maturitätsprüfung (Typus B) bestand. Im Wintersemester 1952 immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, wo ich Chemie als Hauptfach belegte.

Während des Studiums bestand ich folgende Prüfungen:

Nebenfachexamina in Mineralogie, Physikalischer Chemie und Nationalökonomie, sowie die Vorexamina in anorganischer und organischer Chemie und Farbenchemie. Im Oktober 1958 begann ich die vorliegende Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.M.Brenner.

Im Verlaufe meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika folgender Dozenten:
P.Bearth, G.Bombach, M.Brenner, H.Dahn, H.Erlenmeyer, M.Geiger-Huber, C.A.Grob, P.Huber, W.Kuhn, T.Reichstein, E.Salin, E.Wenk und R.Wizinger.